

УДК 576.895.122 : 575.3

© 1991

**КАРИОТИП GORGODERA PAGENSTECHERI
(GORGODERIDAE: TREMATODA)****Я. В. Баршене**

Эмбриональные клетки зародышевых шаров спороцист *Gorgoderia pagenstecheri* содержат 18 хромосом. Среди них 1—3-, 5-, 7-, 8-я пары представлены акроцентрическими хромосомами, 6-я пара — субметацентрическими, 9-я — метацентрическими элементами. Хромосомы 4-й пары относятся к субтелоцентрическому-acroцентрическому типу. Первые четыре пары включают 63 % хромосомного материала.

Анализ рестрикционных сайтов эндонуклеазы Eco R 1 выявил обилие GAATTC ДНК повторов в хромосомах 1—4-й пар и их незначительное количество в хромосомах 5—8-й пар *G. pagenstecheri*.

Жизненный цикл трематод сопровождается сложнейшим метаморфозом и нередко возникают проблемы идентификации видов или выяснения филогенетических связей различных таксонов данного класса гельминтов. Характеристики хромосомного аппарата практически не изменяются в онтогенезе, что позволяет не только выявлять видовую принадлежность отдельных стадий жизненного цикла, но и устанавливать степень родства различных таксонов.

Кариологические исследования трематод сем. Gorgoderidae ранее были проведены у 6 видов. В половых клетках *Gorgoderia amplicava* и *Phyllodistomum spatula* описано по 8 хромосом (Britt, 1947; Dhingra, 1954), *Gorgoderina attenuata* — 7 (Willey, Koulisch, 1950), *Probilotrema californiense* — 6 (Britt, 1947). В диплоидных наборах *Phyllodistomum conostomum* нами было выявлено 16 элементов, у *Ph. pungitii* — 18 структурных единиц генома (Баршене, Орловская, 1990). Трематоды рода *Phyllodistomum* нами были обнаружены на территории Северо-Западной Чукотки.

Целью настоящей работы было определение особенностей структурной организации хромосомного аппарата *Gorgoderia pagenstecheri*, партениты которой обнаружены в небольшой р. Вильняле, вблизи г. Вильнюса. На основе кариометрических данных по трем изученным нами видам горгодерид проведен также сравнительно-кариологический анализ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Во время комплексных исследований экологической ситуации в р. Вильняле ниже рыбхоза Маргяй были выявлены биотопы, где обитали моллюски *Sphaerium corneus*. Среди них 7 экз. были заражены партенитами *G. pagenstecheri*. Хромосомные комплексы изучены в эмбриональных клетках зародышевых шаров спороцист. Применялись обычные методы сбора, фиксации, приготовления препаратов и кариометрии (Baršienė, Grabda-Kazubská, 1988). Классификация хромосом осуществлена по методу Левана с соавторами (Levan et al., 1964). Часть препаратов была обработана рестриктазами: Mva I, Eco R I, Msp I и Eco 32 I. Рестрикционные эндонуклеазы были получены

Измерения хромосом *Gorgodera pagenstecheri*
Measurements of chromosomes of *Gorgodera pagenstecheri*

Номер пар хромосом	Длина хромосом, мкм M±SD	Относительная длина хромосом M±SD	Центромерный индекс M±SD	Тип хромосом
1	7.26±0.69	19.79±0.51	7.00±0.82	a
2	6.72±0.61	18.32±0.34	4.00±1.10	a
3	5.12±0.65	13.83±0.73	10.53±2.05	a
4	4.01±0.34	10.97±0.34	17.55±2.06	st—a
5	3.38±0.28	9.24±0.25	5.86±1.67	a
6	3.20±0.21	8.76±0.23	28.73±4.19	sm
7	2.55±0.23	6.99±0.29	9.92±2.84	a
8	2.35±0.19	6.43±0.29	6.84±2.37	a
9	2.07±0.20	5.67±0.36	48.52±0.90	m

Примечание. a — акроцентрические, st — субтелоцентрические, sm — субметацентрические, m — метацентрические хромосомы

из Научно-производственного объединения «Фермент», г. Вильнюс. Эндонуклеазы были суспендированы в соответствующих буферах и нанесены на препараты, содержащие митозы *G. pagenstecheri*. Концентрацию эндонуклеаз в смеси реакции изменяли от 0.2 до 10 ед./мкл. Реакция протекала в течение 3.5—4 ч в термостате при 37°. Препараты промывали дистиллированной водой и окрашивали 2%-ным раствором Гимзы, приготовленном на фосфатном буфере.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диплоидный набор хромосом *G. pagenstecheri* равняется 18 (рис. 1). Кариотип состоит из 4 пар крупных и 5 пар мелких элементов. Абсолютная длина хромосом варьирует от 2.07 до 7.26 мкм (см. таблицу). Длина 4 пар крупных хромосом составляет почти 63 % от длины всего гаплоидного набора. В то же время остальные 5 пар элементов включают лишь 37 % хромосомного материала. Первая пара представлена акроцентрическими хромосомами, длина которых составляет в среднем 19.79 % от длины всего гаплоидного набора. Акроцентрическими оказались элементы 2, 3, 5, 7, 8-й пар. Хромосомы 4-й пары чаще всего содержали субтерминально расположенную центромеру, однако в некоторых клетках эти хромосомы относились к акроцентрическому типу. Субмедальная локализация центромер характерна для элементов 6-й пары, медиальная — для самых мелких хромосом 9-й пары.

Рестрикционная активность эндонуклеаз на ДНК хромосом трематод была изучена впервые. При концентрации рестриктаз 0.2, 1 и 2 ед./мкл (в смеси реакции) эффектов не было выявлено. Активность эндонуклеазы Eco R 1 была выявлена при концентрации 5 и 10 ед./мкл. Инкубация препаратов осуществлялась 3.5—4 ч при температуре 37°. На хромосомах 1—4-й пар определены мелкие диски, общий вид которых слегка напоминал G-дифференциальную окраску. Довольно отчетливо выявились темноокрашенные участки коротких плеч хромосом 3-й пары. Хромосомы 5—8-й пар оказались почти полностью интенсивно окрашенными (рис. 2).

При изучении рестрикционной активности эндонуклеаз Mva 1, Eco 32 1 и Msp 1 дифференциального окрашивания хромосом *G. pagenstecheri* не получили. Иногда под воздействием рестриктазы Msp 1 (10 ед./мкл) появлялись диски в зонах околоцентромерного гетерохроматина.

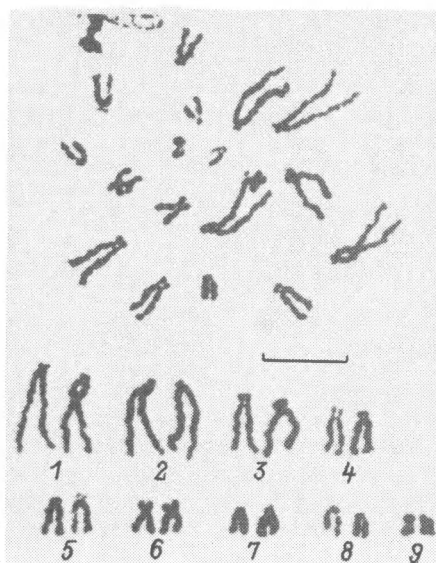


Рис. 1. Метафазные хромосомы и кариотип *Gorgoderia pagenstecheri*. Шкала — 10 мкм.

1—9 — номера хромосом.

Fig. 1. Metaphase chromosomes and karyotype of *Gorgoderia pagenstecheri*.

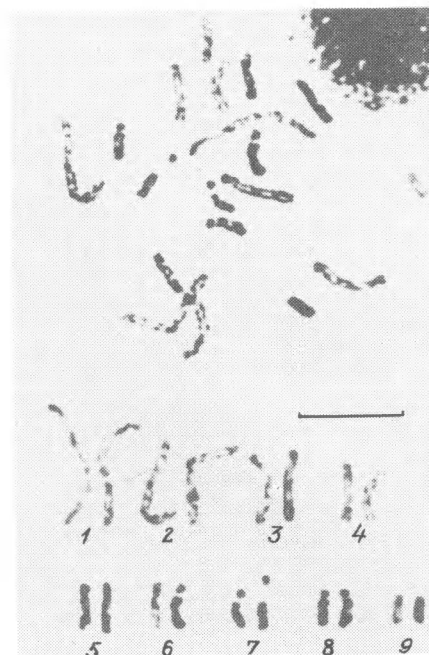


Рис. 2. Хромосомы *G. pagenstecheri* после реакции с рестриказой *Eco R I*.

Остальные обозначения такие же, как на рис. 1.

Fig. 2. Chromosomes of *G. pagenstecheri* after the reaction with *Eco R I*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно филогенетической схеме, предложенной Бруксом с соавторами (Brooks e. a., 1985), трематоды сем. Microphallidae, Gorgoderidae, Opescoelidae, Zoogonidae, Lissorichidae являются близкородственными формами. В схеме Кэйбла (Cable, 1974) самые близкие родственные связи были отмечены между трематодами сем. Gorgoderidae, Allocreadiidae, Opescoelidae, Zoogonidae и Troglotrematidae. В обеих схемах родственными формами Gorgoderidae считаются трематоды сем. Opescoelidae и Zoogonidae. Весьма важную информацию о филогенетических взаимоотношениях дают кариологические исследования. К сожалению, хромосомные комплексы трематод сем. Zoogonidae, Lissorichidae пока не изучены. Вид *Sphaerostoma bramae* (Opescoelidae) содержит 24 хромосомы (Gresson, 1958). Кариотипы других видов данного семейства неизвестны. 3 вида микрофаллид имеют в кариотипах по 18 хромосом (Бирштейн, Михайлова, 1989), среди которых доминируют метацентрические и субметацентрические хромосомы, однако кариометрические данные для микрофаллид отсутствуют, поэтому их кариотипы нельзя сравнить с кариотипами трематод сем. Gorgoderidae.

Все изученные кариологическими методами виды сем. Troglotrematidae имеют по 22 хромосомы, за исключением вида *Paragonimus kellicotti*, содержащего 16 элементов (Benazzi, Benazzi-Lentati, 1976). Представители сем. Allocreadiidae составляют кариологически разнородную группу трематод. У *Allocreadium fasciatus* $3n=21$ (Ramanjaneyulu, Madhavi, 1984), у *Bunodera sacculata* $3n=23, n=8$ (Cannon, 1971). Партеногенетическое поколение *B. lucioper-*

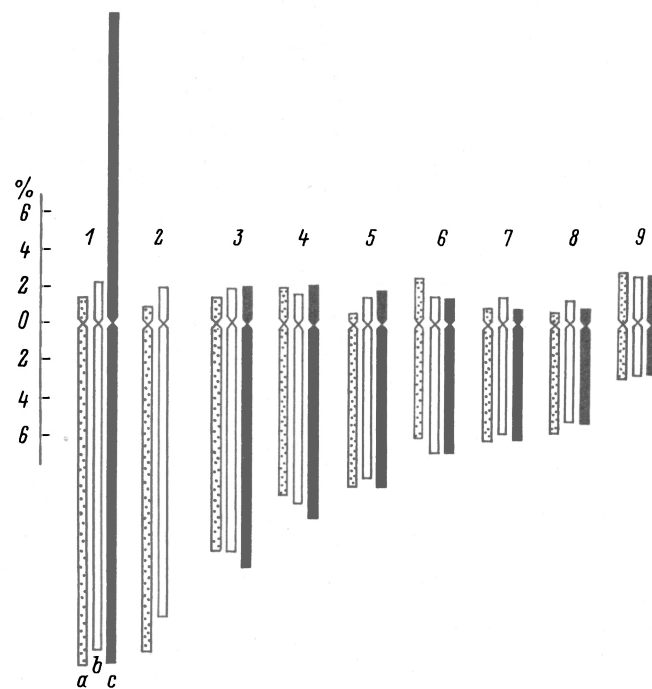


Рис. 3. Идеограмма хромосом *Gorgoderidae pagenstecheri*, *Phyllodistomum conostomum* и *Ph. pungitii*. Идеограммы построены по данным измерения центромерных индексов и относительных длин, представленных в таблице и в работе Баршине, Орловская (1990).

Относительная длина хромосом (о): а — *Gorgoderidae pagenstecheri*, б — *Phyllodistomum pungitii*, с — *Phyllodistomum conostomum*.

Остальные обозначения такие же, как на рис. 1.

Fig. 3. Relative length of chromosomes. Ideogram of gorgoderids on the basis of relative sizes and centromere index of chromosomes.

cae содержит 26 хромосом (Баршине, Орловская, 1990). В половых клетках мариит *A. isoporum* и *Crepidostomum serpentinum* описано по 16 хромосом (Britt, 1947). 14 хромосом обнаружено в кариотипе *A. handiai* (Ramanjaneyulu, Madhavi, 1984). Следовательно, имеющиеся в литературе данные о кариотипах трематод сем. Gorgoderidae и их близкородственных форм пока не позволяют судить об их филогенетических взаимоотношениях.

Анализ кариометрических характеристик трех изученных нами видов сем. Gorgoderidae указывает на то, что кариотип *G. pagenstecheri* наиболее сходен с кариотипом *Phyllodistomum pungitii* (рис. 3). При этом межродовые различия в наборах хромосом меньше, чем межвидовые. Более корректное объяснение данного феномена можно получить с помощью анализа дифференциальной структуры хромосом, в частности методами хромосомной ДНК рестрикции *in situ*.

Каждая рестрикционная эндонуклеаза способна узнавать специфические ДНК повторы и после реакции образовать своеобразную картину распределения дисков на хромосомах (Bianchi e. a., 1984, 1985a, 1985b; Kaelbling e. a., 1984; Lloyd, Thorgaard, 1988). Возникновение дисков на хромосомах является результатом потери ДНК фрагментов и тем самым способности хромосом к равномерной интенсивной окраске (Miller e. a., 1983; Bianchi e. a., 1985a).

Рестриктаза *Eco R* 1, полученная из *E. coli* штамма RY 13, узнает короткие ДНК повторы GAATTC. Хромосомы 1—4-й пар *G. pagenstecheri* насыщены

этими повторами, и под воздействием Есо R 1 выявляются мелкие, более интенсивно окрашенные участки хромосом. Интенсивно окрашенные крупные фрагменты или почти полностью целые хромосомы 5—8-й пар, по всей вероятности, содержали значительно меньшее количество ГААТТС повторяющихся последовательностей ДНК. Необычайно важную информацию можно будет получить при изучении частоты рестрикционных сайтов у родственной формы *Phyllo-distomum pungitii* и других представителей сем. Gorgoderidae. Выявление мест локализации и перемещения рестрикционных сайтов ДНК предоставит возможность изучить закономерности преобразования генетического материала в эволюции трематод и установить их филогенетические взаимоотношения.

Список литературы

- Баршене Я. В., Орловская О. М. Кариологические исследования трематод семейств Allocreadidae, Plagiorchiidae и Gorgoderidae из Северо-Западной Чукотки // Паразитология. 1990. Т. 24, вып. 2. С. 121—127.
- Бирштейн В. Я., Михайлова Н. А. Кариотипы трех видов морских трематод рода Microphallus (Microphallidae) // Зоол. журн. 1989. Т. 68, вып. 1. С. 21—27.
- Barsiene J., Grabda-Kazubska B. A comparative study on chromosomes in plagiiorchiid trematodes. I. Karyotypes of Opisthioglyphe ranae (Frölich, 1791), Haplometra cylindracea (Zeder, 1800) and Leptophallus nigrovenosus (Bellingham, 1844) // Acta Parasitol. Polonica. 1988. Vol. 33, N 4. P. 249—257.
- Benazzi M., Benazzi-Lentati G. Platyhelminthes // Animal cytogenetics. Ed. B. John. Berlin, Stuttgart: Gerzuder Borntraeger 1976. Vol. 1. 182 p.
- Bianchi N. O., Bianchi M. S., Cleaver J. E. The action of ultraviolet light on the patterns of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes // Chromosoma. 1984. Vol. 90. P. 133—138.
- Bianchi M. S., Bianchi N. O., Pantelias G. E., Wolff S. The mechanism and pattern of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes // Chromosoma. 1985a. Vol. 91. P. 131—136.
- Bianchi N. O., Bianchi M. S., Cleaver J. E., Wolff S. The pattern of restriction enzyme-induced banding in the chromosomes of chimpanzee, gorilla, and orangutan and its evolutionary significance // J. Mol. Evol. 1985b. Vol. 22. P. 323—333.
- Britt H. G. Chromosomes of digenetic trematodes // Amer. Natur. 1947. Vol. 81. P. 276—296.
- Brooks O. R., O'Grady R. T., Glen D. R. Phylogenetic analysis of the Digenea (Platyhelminthes: Cercomeria) with comments on their adaptive radiation // Can. J. Zool. 1985. Vol. 63. P. 411—443.
- Cable R. M. Phylogeny and taxonomy of trematodes with special reference to marine species // Symbiosis in the sea. Edited by W. B. Verberg. Carolina Press, Columbia, SC. 1974. P. 173—194.
- Cannon L. R. G. The life cycles of Bunodera sacculata and B. luciopercae (Trematoda: Allocreadidae) in Algonquin Park, Ontario // Can. J. Zool. 1971. Vol. 49. P. 1417—1429.
- Dhingra O. P. Taxonomic values of chromosomes and cytoplasmic inclusions in a digenetic trematode—Phyllodistomum spatula // Res. Bull. Panjab Univer. Zool., 1954. Vol. 51. P. 101—109.
- Gresson R. A. R. The gametogenesis of the digenetic trematode, Sphaerostoma bramae (Müller) Lühe // Parasitology. 1958. Vol. 48. P. 293—302.
- Kaelbling M., Miller D. A., Miller O. J. Restriction enzyme banding of mouse metaphase chromosomes // Chromosoma. 1984. Vol. 90. P. 128—132.
- Levan A. K., Fredga K., Sandberg A. A. Nomenclature for centromere position on chromosomes // Hereditas. 1964. Vol. 52. P. 201—220.
- Lloyd M. A., Thorgaard G. H. Restriction endonuclease banding of rainbow trout chromosomes // Chromosoma. 1988. Vol. 96. P. 171—177.
- Miller D. A., Choi Y. C., Miller O. J. Chromosome localization of highly repetitive human DNA's and amplified ribosomal DNA with restriction enzymes // Science. 1983. Vol. 219. P. 395—397.
- Ramanjaneyulu J. V., Madhavi R. Cytological investigations on two species of Allocreadid trematodes with special reference to the occurrence of triploidy and parthenogenesis in Allocreadium fasciatum // Intern. J. Parasitol. 1984. Vol. 14, N 3. P. 309—316.
- Wiley C. H., Koulish S. Development of germ cells in the adult stage of the digenetic trematode, Gorgoderina attenuata Stafford, 1902 // J. Parasitol. 1950. Vol. 36. P. 67—79.

Институт экологии АН Литвы,
г. Вильнюс

Поступила 30.03.1990

KARYOTYPE OF GORGODERA PAGENSTECHERI (GORGODERIDAE: TREMATODA)

Ja. V. Barshene

Key words: *Gorgodera pagenstecheri*, chromosomes, karyotype, restriction, DNA sequences

S U M M A R Y

The diploid number of chromosomes in the cells of germinal balls of *Gorgodera pagenstecheri* is equal to 18. The structure of karyotype was: 1—3rd, 5th, 7th, 8th, A+4th, ST-A+6th SM+9th M. Chromosomes of the 1st to 4th pairs constitute 63 % of the total haploid set length.

The analysis of restriction endonuclease sites of Eco R 1 has revealed the abundance of repeat DNA sequences (GAATTC) on the chromosomes of the 1—4th pairs and their insignificant amounts on the chromosomes of the 4—8th pairs of *G. pagenstecheri*.
